

ける肝細胞の反応の差を遺伝子レベルでダイナミックに検出することとなり、in vitro 実験は化学物質が生体に及ぼす影響をリスクアセスメントする際に用いることが出来るか否かの問いに重要な示唆を与える。

○初代培養肝細胞の培養

●動物

B6C3F1 マウス (8 週齢、雄) (Japan Charles River) を温度 23~25℃、湿度 50~60%、12 時間の明暗サイクル下で馴化させ、初代培養肝細胞の分離に用いた。

●初代培養肝細胞の分離及び培養

Beken S、LeCluyse EL らのプロトコールを部分的に修正し、以下の手順で新鮮な初代培養肝細胞を分離、培養した。使用した試薬については参照 1 に示した。

○マウス肝細胞の分離法

1. マウス (8 週齢) の腹腔内に Nembutal (5mg/ml)⁽¹⁴⁾ を 0.5ml 注射し麻酔を行った。麻酔が効いたら消毒用エタノールを噴霧し全身を消毒した。
2. マウスをクリーンベンチ内に設置した解剖台にピンで固定し、ハサミで皮膚、腹筋を順に切開した。門脈を露出させるために腸を術者の右手側にかき寄せ、針で固定させた。
3. 門脈に 20G のサーフロー留置針 (外筒の先 1cm をハサミで溝を作る) を挿入し内筒引く。血液が留置針内を満たしたら (別に Preperfusion Buffer⁽⁵⁾ 入りのシリンジを用意し外筒内に注入してもよい) チューブをつないで Preperfusion Buffer⁽⁵⁾ を 4.8ml/min, 37℃ で流し入れた。このとき留置針内に空気が混入すると肝

臓内で空気栓が出来てしまい灌流できない。

4. 灌流を開始すると肝臓の血液が押し出され、肝が赤褐色から黄褐色に変化。肝が膨大したら後大静脈に 18G のサーフロー留置針 (同じように外筒の先 1cm をハサミで溝を作る) を挿入し内筒を引く。外筒にチューブをつないで廃液した。廃液するチューブの高さにより肝臓への圧力が変化し灌流に大きく影響するため肝臓の膨らみの程度を観ながら手術台より数センチの高さに固定した。

5. 6 分後、灌流液を Preperfusion Buffer⁽⁵⁾ から Collagenase Buffer⁽⁶⁾ に切り替え、8 分間さらに灌流した。

6. 灌流が終了したら、留置針をはずした。胆嚢をピンセットで除去し、肝臓をハサミを用いて摘出した。このとき肝臓はとろけるような状態になっていた。

7. 摘出した肝臓を WEid⁽¹⁰⁾ が入ったシャーレ上に移し、広口の駒込ピペットで緩やかにピペッティングして肝細胞を遊離させた。

8. 肝細胞浮遊液を mesh で濾過し、これを低速遠心 (50×g, 1min) した。上清を吸出しペレットを再び WEid⁽¹⁰⁾ で分散し低速遠心した。この操作をあわせて 3 回繰り返す。この操作で肝細胞を精製した。

9. 精製した肝細胞を Trypan Blue で染色を行い生存率 85% 以上の細胞群を培養に供した。

○マウス肝細胞のコラーゲン重層培養法

1. 5%CO₂ で Bubbling した WEid・FBS⁽¹¹⁾ 培地に分離精製したマウス肝細胞を 7.5 × 10⁵/ml の濃度で分散した。
2. コラーゲンをコートした 25cm² のプラス

- コに細胞を分散した培養液を 6ml 播種した。フラスコの栓は閉じた状態にし、37℃ インキュベーターで 4 時間、培養した。
3. 4 時間後、細胞の接着・伸展を確認し、WEid・FBS⁽¹¹⁾をアスピレーターで吸引し 1×PBS で 2 回洗浄し、事前に調製したコラーゲン I 溶液⁽¹³⁾を 1ml 重層した。
 4. 37℃、CO₂ インキュベーターで 45 分から 1 時間静置し、コラーゲン I 溶液⁽¹³⁾をゲル化させた。
 5. コラーゲン I 溶液がゲル化したら、5% CO₂ で Bubbling した HepatoZYME・L-glutamine⁽¹²⁾培地を 6ml 入れ 36 時間 37℃、CO₂ インキュベーターで培養した。
 6. 36 時間後、曝露実験に供した。

●培養肝細胞への曝露及び totalRNA の抽出

○TCE 曝露実験法

1. 5 % CO₂ で Bubbling した HepatoZYME・L-glutamine⁽¹²⁾培地で DMSO、TCE 2.5mM、TCE 5mM の濃度の培養液を作成した。
2. HepatoZYME・L-glutamine⁽¹²⁾培地で 36 時間培養した細胞の培地を 1 で作成した曝露実験用の培地に交換した。
3. 培地交換後 4 時間と 24 時間に tRNA の抽出を行った。

○培養細胞からの tRNA の抽出

1. 培養液を吸引し、1×PBS で洗浄した。
2. 10ml の TRIzol をフラスコに入れピペッティングを行った。
3. セルワイパーで細胞をフラスコから剥離した後、もう一度ピペッティングを行った。
4. 50ml の Centrifuge Tube に移し、室温で 5 分間静置。

5. 2ml のクロロホルムを加え、15 秒間、手で攪拌。
6. 室温で 3 分間静置。
7. 12000×g で 4℃、15 分間、遠心。
8. 上清を新しい 50ml の Centrifuge Tube に移し、5ml のイソプロパノールを加え 10 分間静置。
9. 12000×g で 4℃、10 分間、遠心。
10. 上清を捨て、10ml の 75%エタノールを加え、7500×g で 4℃、5 分間、遠心。
11. 上清を捨て 20μl の DEPC-treated water で溶解。

○予備実験

この項では in vitro 実験を行うにあたり、細胞の培養条件と曝露条件を検討するために行った予備実験の結果について述べる。

肝臓は多種多様な生理機能を営む代謝活性の高い臓器であり、薬剤や有害化学物質の毒性評価をしていく上では重要な臓器であるが、in vivo の生体反応を in vitro で再現するのは難しく種々の研究開発がこれまでになされてきた。コラーゲナーゼを用いる肝還流法は比較的高い肝細胞の viability を保ったまま細胞を分離する一般的な方法であり、我々もこの方法を採用した。また分離した細胞を培養する種々の条件が in vivo の生体反応の再現性に大きく関与しており、様々な研究が行われている。特に細胞外マトリックスは初代培養肝細胞の長期培養を可能とし、肝細胞の形態や機能の維持、チトクローム系酵素の活性維持に大きく貢献する。我々は幾つかの細胞外マトリックス中で初代培養肝細胞を培養し、曝露実験を行って目的とする遺伝子発現の変化が得られる細胞外マトリックスの

environment、細胞濃度及び培地を購入するヒトの初代培養肝細胞の environment も考慮して決定した。また in vitro 実験の曝露条件を決定するにあたり、我々は in vivo 実験で TCE 曝露によって DNA チップ上で遺伝子発現が変化し、かつその遺伝子発現変化が既知の知見から判断して適当であると思われる遺伝子を複数個選択した。これらの遺伝子は主に TCE の肝臓における代謝に関与しているチトクローム系酵素、及びペルオキシゾーム関連酵素等である。この予備実験の結果を具体的に以下で述べ、代謝産物 (TTC: 総塩化物、TCA: トリクロロ酢酸) 及び LDH の結果を図 1A-8A に示す。定量 PCR による RNA の半定量的結果を図 1B-8B に示す。定量 PCR は、PCR によって、PCR 反応は再現性を高める目的で、それぞれの遺伝子に対して PCR 反応を 3 回ずつ行い、増幅曲線と解離曲線を得て平均値をその遺伝子の C_t 値 (増幅曲線において閾値を越えるサイクル数) とした。曝露サンプルはそれぞれのコントロールサンプルと endogenous control gene である β -actin で補正し、コントロールサンプルに対する相対的な遺伝子発現変化を算出した。各遺伝子の mRNA 発現量を半定量した。図 1B-8B に示した RNA の半定量的結果は、縦軸はコントロールに対する変化の倍数を示している。またこれらの予備実験の結果の要約を表 1 に示した。

1) 至適培地の選択 (予備実験 2)

細胞が Flask に接着するまでは WE (Williams' medium E) に FBS(5%) を添加し、更に肝細胞増殖因子であり肝細胞の接着を促進する 1×10^{-7} M dexamethasone

と $4 \text{mU/ml} (=2.3 \times 10^{-8})$ insulin をそれぞれ最終濃度となるように加え、95% O_2 , 5% CO_2 で bubbling 後、37℃インキュベータで 4 時間培養した。なお 1×10^{-6} M dexamethasone の環境下で培養した場合、CYP2E1 の mRNA の薬剤による誘導がわからず、遺伝子の発現が減少したという報告(Waxman et al., 1990, Dwivedi et al., 1992)があったため、上記の濃度を選択した。我々は細胞が Flask に接着後、培地を dexamethasone、FBS (・) もしくは Hepatozyme に交換し、代謝産物の産生と主要な遺伝子の遺伝子発現変化を両者の培地で比較した。

●方法

8 週齢 オス B6C3F1 マウスの肝臓より分離した初代培養肝細胞に、DMSO (コントロール群)、DMSO に溶解した 0.5mM の TCE、DMSO に溶解した 5mM の TCE を曝露し、4 時間後と 12 時間後に曝露群のコントロール群に対する遺伝子発現の変化を定量的 PCR 法を用いて半定量した。また、培地中に含まれている TCE 代謝産物(TCA、TTC)、及び肝細胞の viability を知る目的で LDH を測定した。選択された遺伝子は in vivo 実験で TCE 曝露によって DNA チップ上で遺伝子発現が変化し、かつその遺伝子発現変化が既知の知見から判断して適当であると思われる遺伝子であり、これらの遺伝子は主に TCE の肝臓における代謝に関与しているチトクローム系酵素、及びペルオキシゾーム関連酵素等である。選択した遺伝子は上述の条件を満たしたものであるが、具体的には Cyp4a10, Cyp2a4, Cyp2b10, Cyp2e1, ADH, AOX, catalase, Urate Oxidase, PPAR α

SSA β -actin である。

●結果

LDH は WEid < Hepatozyme < 35 (IU/l) であった。代謝産物は WEid > Hepatozyme であった。

細胞形態は細胞を巻き込み、培地を交換後 12 時間で WEid と Hepatozyme の間に差が観察された。WEid は明らかに細胞の伸展が進んでおり、個々の細胞が樹上状に伸展していた。一方 Hepatozyme では、個々の細胞の形態は丸みをおびており、隣接する細胞と連絡が保たれている様子が観察された。

遺伝子発現量の変化は、WEid に変化が見られなかったのに対し、Hepatozyme は 5mM TCE の 12 時間、24 時間曝露でチトクローム系酵素の遺伝子発現の増加が観察された。

2) 細胞の撒き込み数 (予備実験 6)

細胞の培養環境として、細胞外マトリックス以上に細胞の濃度が重要であると述べている文献(Geraldine et al., 2001)があり、至適細胞濃度を決定する目的で 5×10^5 cell/ml と 1×10^6 cell/ml で予備実験を行った。細胞外マトリックスは collagen coat-collagen gel sandwich を使用した。

●結果

5×10^5 cell/ml では 24 時間 5mM 曝露でチトクローム系酵素の遺伝子発現増加が観察されたのに対し 1×10^6 cell/ml では 24 時間 0.5mM 曝露からチトクローム系酵素の遺伝子発現増加が観察された。また、LDH は 5×10^5 cell/ml < 1×10^6 cell/ml < 20 であり、TTC は 5×10^5 cell/ml < 1×10^6 cell/ml であった。

細胞同士の相互作用は化学物質による肝細胞の反応に重要な役割を果たすという報告 (細胞密度はリファンピシンに誘導される CYP3A4 の発現、細胞骨格 element と cell-cell adhesion と communication に関わるタンパクとの配置に大きな影響を与えている。) もあり、我々は巻き込む細胞密度を 1×10^6 cell/ml とすることとした。

3) 細胞外マトリックス (予備実験 2-4)

細胞外マトリックとして、collagen coat、Matrigel、collagen coat-collagen sandwich、collagen coat-Matrigel の比較を行った。collagen coat (予備実験 2、3) は 24 時間 5mM 曝露でチトクローム系酵素の遺伝子発現増加が観察された。しかし個々の細胞は樹状に伸展した形態をしており、細胞間の連絡は他の細胞外マトリックを使用した場合に比べ、密に保たれている様子ではなかった。同じ面積に同じ密度で撒いた細胞より抽出し totalRNA 量は一番多かった。これは肝細胞が脱分化、伸展、増殖しているためと思われる。実際 collagen-coat で初代培養肝細胞を培養した場合、24 時間から 48 時間で細胞の数はほぼ 2 倍に増殖することが観察されている。チトクローム系酵素の活性は collagen-coat の場合 2 日までは維持されているが、それ以後は暫減している。

Matrigel (予備実験 4) は 12 時間 5mM 曝露で Cyp4A10、Cyp2A4 の遺伝子の発現増加が、24 時間 5mM 曝露では Cyp2B10 の遺伝子発現増加が観察された。Matrigel 上で培養された初代培養肝細胞はアルブミン分泌などの肝機能が細胞分離前のレベルを維持されており、特に薬物代謝酵素で

あるチトクローム系酵素の薬物による誘導、及び薬物による脂質代謝の変動が維持されると言われている。(文献4) これは HNF-4, C/EBP α といった肝臓特異的転写因子が維持されることにより、その転写因子に支配されている遺伝子発現が維持されているためと考えられている。一方、細胞成長関連の転写因子の発現は抑制されていて、細胞成長と脱分化は抑制されている。これらは Immediate-Early Growth Response 遺伝子である C-jun, jun-B, C-myc の遺伝子発現が抑制されていることにより、細胞は G0 期で休止していることを示唆している。(Rana et al., 1994, Bucher et al., 1994) 培地中の代謝産物の濃度は T T C のみ検出されたが、極めて低い値であった。また 3×10^6 cell の細胞から得られる totalRNA 量は少なく、DNAチップにハイブリダイゼーションさせる量を抽出することは困難であった。

collagen coat:collagen sandwich (予備実験 5-10) を使用した場合は 24 時間 2.5mM 曝露で Cyp2e1 が、24 時間 5 mM 曝露では Cyp2e1 及び Cyp2A4 の遺伝子発現の増加が観察された。培地中の代謝産物は T C A は検出限度以下の値であり、T T C 値は量反応的な上昇が確認されたが、collagen coat のみの単層培養に比べると低い値であった。なおこの細胞外マトリックスは海外より取り寄せるヒトの初代培養肝細胞はこの細胞外マトリックスと同じである collagen coat:collagen sandwich 法を採用している。

4) collagen gel 重層までの時間(予備実験 5)

細胞は seeding 後 1 時間程で Flask に接着をはじめるとされているが、collagen gel を重層する際は 3-4 時間後に行っている文献 (LeCluyse EL et al. 1996) と 24 時間後に行っている文献 (Beken S et al. 1998) があつた。よって 2 つの collagen gel 重層までの時間を比較する実験を行った。24 時間後重層は collagen gel の重層が容易であった。一方 4 時間後重層は overlay した collagen gel が容易に剥がれ、実験の中止を余儀なくされることが多かった。遺伝子発現の変化は 24 時間後重層に比べ 4 時間後はチトクローム系酵素の遺伝子発現の増加が大きかった。細胞形態を観察すると、細胞を seeding 後 3-4 時間後では、個々の細胞は Flask に完全に接着しているが伸展はあまり進んでいない。一方 24 時間後は細胞は伸展し、隣接する細胞同士が接触し合って monolayer を形成し、明らかに 3-4 時間後と細胞形態が異なっている。脱分化を思わせる細胞の伸展は 3) の細胞外マトリックスの項で述べたように、肝機能維持の面からは好ましくない。よって我々は重層した collagen gel が容易に剥がれるという難点を持つが、4 時間後に collagen を重層することとした。

5) 曝露濃度の検討 (予備実験 6-8)

曝露濃度と曝露時間は in vivo 実験と比較することを念頭において決定した。

De Smet らは、0.5mM TCE と 5.0mM TCE をラット肝細胞に曝露すると、S9 中の TCE

濃度はそれぞれ 23、122 μ M になると述べている。(De Smet et al., 2000) この値は in vivo におけるヒトへの TCE 曝露の影響と

よく相関している。ACGIHは8hr-TWAを50ppm、short-time exposure limitを200ppmとしている。50ppmTCE曝露はヒトのblood/air partition coefficientに基づいて計算すると血中のTCE濃度は $16\mu\text{M}$ となる。また(Lipscomb JC et al. 1998)では50ppmをhead spaceに入れてヒト培養肝細胞に密閉曝露すると肝細胞中のTCE濃度はそれぞれ $22\mu\text{M}$ になると言っている。よって0.5mMのラット肝細胞への曝露はヒトへの50ppm曝露におおよそ相当するという計算となる。一方、種々の濃度のTCE代謝産物を肝細胞に曝露しcytotoxicityと β 酸化活性を測定すると、ラットとマウスでは2mM TCA、ヒトでは4mM TCAが細胞障害がなく β 酸化活性が得られた濃度であったと述べている。(Walgren et al. 2000) このTCA濃度は、ラットではTCEの6%がTCAに代謝されとすると(Bernauer et al. 1996))33mM TCEに相当する。また、500ppmTCE (5mMTCEに相当)を肝細胞へ曝露するとcytotoxicityは生じないが、チトクローム系酵素の活性化が観察されたとする報告もある。

これらの知見より、我々は5mM TCEを基準の曝露量として、マウス初代培養肝細胞における肝細胞障害性とチトクローム系酵素の遺伝子発現変化を観察する予備実験を行った。

細胞傷害性、遺伝子発現の変化は細胞外マトリックスに依存して変化するが、ここではcollagen coat-collagen sandwichを使用した際の結果について述べる。

我々は0.5mM、1mM、2.5mM、5mM、10mMで至適な曝露濃度の検討を行った。

0.5mM、1mM TCE曝露は代謝産物濃度は極めて低く、チトクローム系遺伝子の発現に変化は見られなかった。2.5mM TCE曝露では、24時間曝露でCyp2E1が2倍の遺伝子発現の増加を示した。5mM TCE曝露と10mM TCE曝露ではCyp2E1は量反应的な遺伝子発現増加(5mMでは3倍程度、10mMでは3.5倍程度)が観察されたが、その他のチトクローム系酵素は5mMでは増加が観察されたが、10mMでは増加が観察されなかった遺伝子もあり、我々は2.5mMと5mMをin vitro実験におけるTCE曝露濃度とした。

6) 曝露時間の検討(予備実験1、4、7)
曝露時間はin vitro実験は血液への吸収を介して肝細胞へ到達するin vivo実験と異なり、直接肝細胞へ曝露するのでTCE曝露による影響が短時間で現れることを考慮に入れなくてはならない。in vivoの腹腔内投与実験では曝露後24時間の肝細胞の遺伝子発現変化を観察したので、最高暴露時間は24時間とした。またin vitroの経口投与実験ではチトクローム系酵素や脂質における β 酸化系酵素の遺伝子の一部が曝露後5時間でその遺伝子発現の増加が観察されたことより、急性期反応として曝露後1、2、4、6時間と急性期反応と、24時間曝露の中間時点である12時間を検討した。

1、2時間曝露は培地中の代謝産物濃度の増加が観察されず、また培地交換した時点よりあまり時間が経過していないことより、細胞が落ち着いていないことが懸念された。チトクローム系酵素、ストレス反応遺伝子の発現増加は観察されなかった。4、6時間曝露ではチトクローム系酵素の遺伝子発現増

加が観察されたが4時間曝露の方が増加の程度は大きかった。

12時間、24時間曝露はその他の曝露時間と比較してチトクローム系酵素遺伝子発現は高く、Matrigelを使用した実験系では24時間曝露で β 酸化系酵素やPPAR α 遺伝子の2倍以上の遺伝子発現増加が観察された。よって我々は4時間と24時間を曝露時間として選択した。

以上の結果より我々は、DNAチップにハイブリダイゼーションさせる細胞の培養条件を以下のように決定した。即ち、コラーゲンを培養ディッシュにコーティングした上に分離した肝細胞を 1.5×10^6 cell/mlで撒き、インスリンとデキサメサゾン含有のWE培地で細胞がディッシュ上に接着するまで培養し、細胞が接着後コラーゲンを細胞の上に重層させて培地をHepatozymeに変更して培養する。これらの方法により、85%以上のviabilityがある肝細胞を分離し、72時間以上の培養後でもこのviabilityを保ち、かつ種々のチトクローム系酵素の誘導能を有する初代培養肝細胞が構築された。

更にこの培養条件で、初代培養肝細胞に種々の曝露濃度と曝露時間でTCEを曝露し、得られたRNAを定量PCR法によって半定量し予備実験を行ったところ、チトクローム系酵素の誘導が遺伝子レベルで観察される曝露条件を見出すことが出来た。具体的にはTCEの主な代謝経路では、マウスとラットにおいてはTCEがCYP2E1によってCHに代謝されることが分かっている。5mM TCEをマウスの初代培養肝細胞に曝露させると、24時間後にはほぼ3倍の遺

伝子発現増加が観察された。また、in vivo実験でその遺伝子発現の増加が確認されたCYP2A4が5mM TCE曝露で24時間後に2倍以上の遺伝子発現の増加を示した。この予備実験の結果によりin vitro実験における適切な曝露条件が決定され、DNAチップにハイブリダイゼーションさせることが可能となった。

次の項では、この培養条件と曝露条件でin vitro実験を行い、マウスの初代培養肝細胞から得られたRNAをDNAチップにハイブリダイゼーションさせた結果について述べる。

健康危害情報

なし

研究発表

1.

中島 宏、佐野有理、出来尾史子、武林 亨、大前和幸、トリクロロエチレン曝露におけるマウス初代培養肝細胞の培養条件の影響の検討。

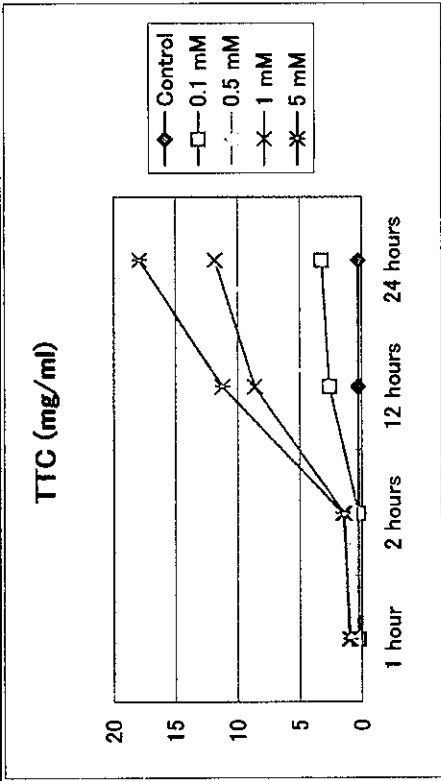
(第76回日本産業衛生学会総会、平成15年4月、山口)

知的財産権の出願・登録状況

未

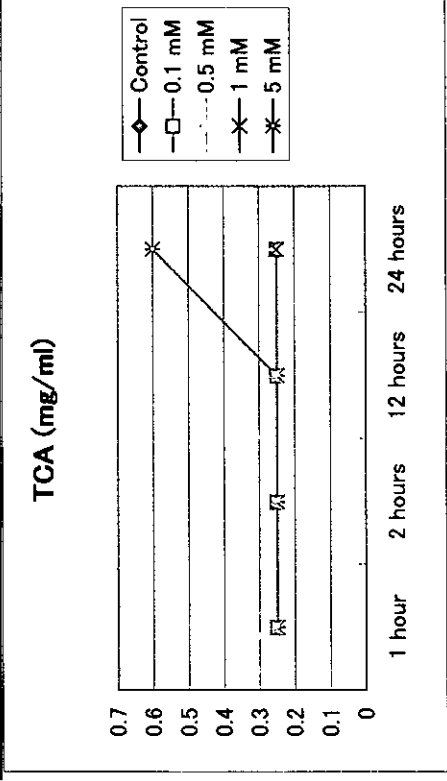
TTC (mg/ml)

	1 hour	2 hours	12 hours	24 hours
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.1 mM	n.d.	n.d.	2.6	3.2
0.5 mM	0.7	1.1	4	11.8
1 mM	1	1.4	8.6	11.8
5 mM	0.9	1.5	11.2	17.9



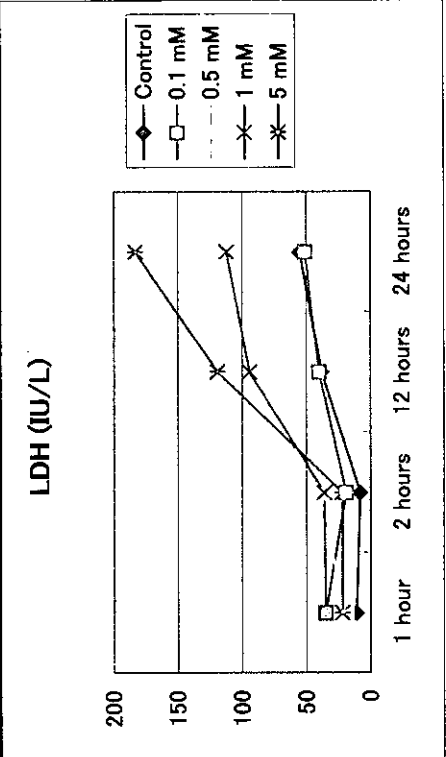
TCA (mg/ml)

	1 hour	2 hours	12 hours	24 hours
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.1 mM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.5 mM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1 mM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5 mM	n.d.	n.d.	n.d.	0.6



LDH (IU/l)

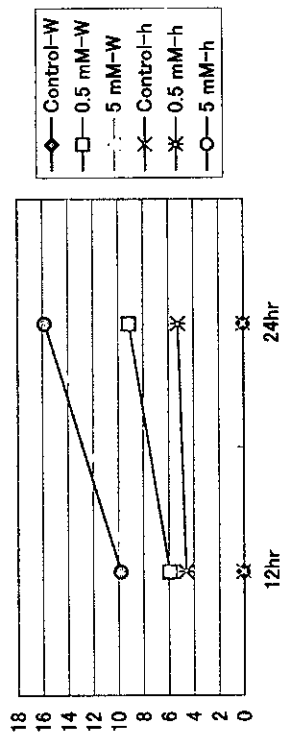
	1 hour	2 hours	12 hours	24 hours
Control	11	8	38	55
0.1 mM	35	19	40	51
0.5 mM	19	41	76	86
1 mM	35	36	94	112
5 mM	22	22	119	183



TTC(mg/ml)

	12hr	24hr
Control-W	n.d.	n.d.
0.5 mM-W	5.9	9.1
5 mM-W	9.1	15.4
Control-h	n.d.	n.d.
0.5 mM-h	4.6	5.2
5 mM-h	9.8	15.8

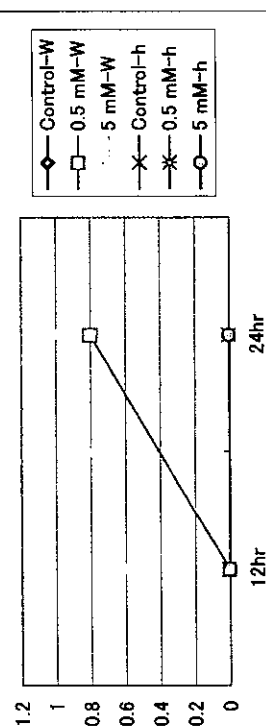
TTC (mg/ml)



TCA (mg/ml)

	12hr	24hr
Control-W	n.d.	n.d.
0.5 mM-W	n.d.	0.8
5 mM-W	0.6	1
Control-h	n.d.	n.d.
0.5 mM-h	n.d.	n.d.
5 mM-h	n.d.	n.d.

TCA (mg/ml)



LDH (IU/l)

	12hr	24hr
Control-W	6	10
0.5 mM-W	10	8
5 mM-W	5	7
Control-h	12	19
0.5 mM-h	13	33
5 mM-h	15	30

LDH (IU/l)

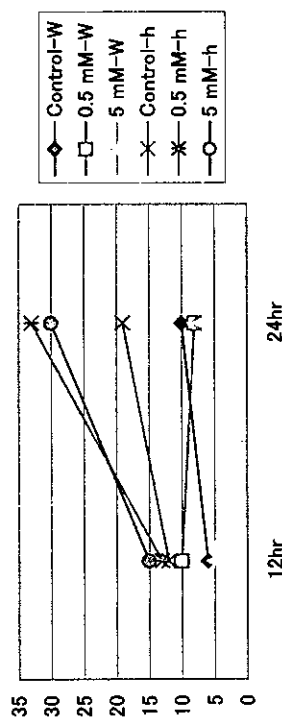


図3A 予備実験3

TTC (mg/ml)		TCA (mg/ml)		LDH (IU/l)	
	12hr	24hr		12hr	24hr
Control-C	n.d.	n.d.	Control-C	214	177
0.5 mM-C	1	1.6	0.5 mM-C	219	200
5 mM-C	4	7.5	5 mM-C	190	186
10mM-C	5	8.3	10mM-C	186	214
Control-M	n.d.	n.d.	Control-M	18	21
0.5 mM-M	n.d.	8	0.5 mM-M	17	8
5 mM-M	0.7	1	5 mM-M	5	6
10mM-M	1.1	2.2	10mM-M	15	13

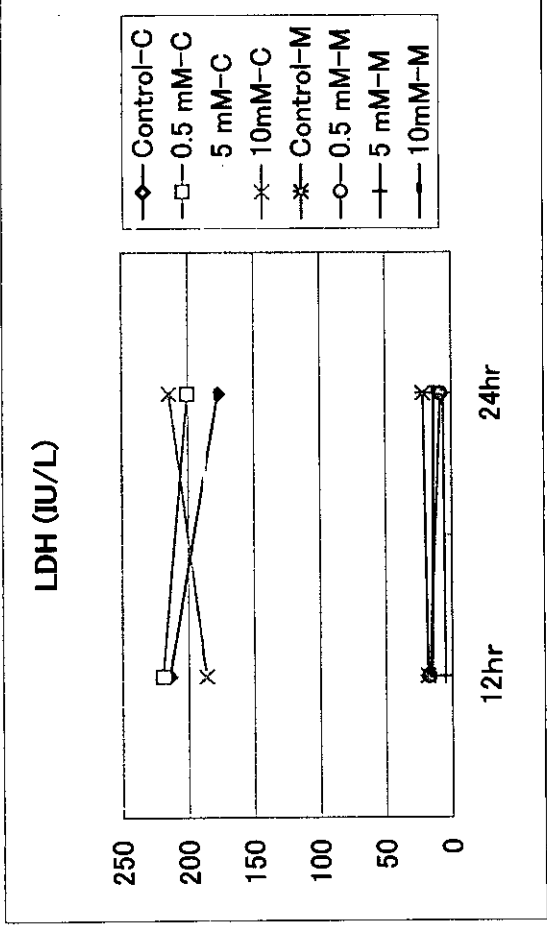
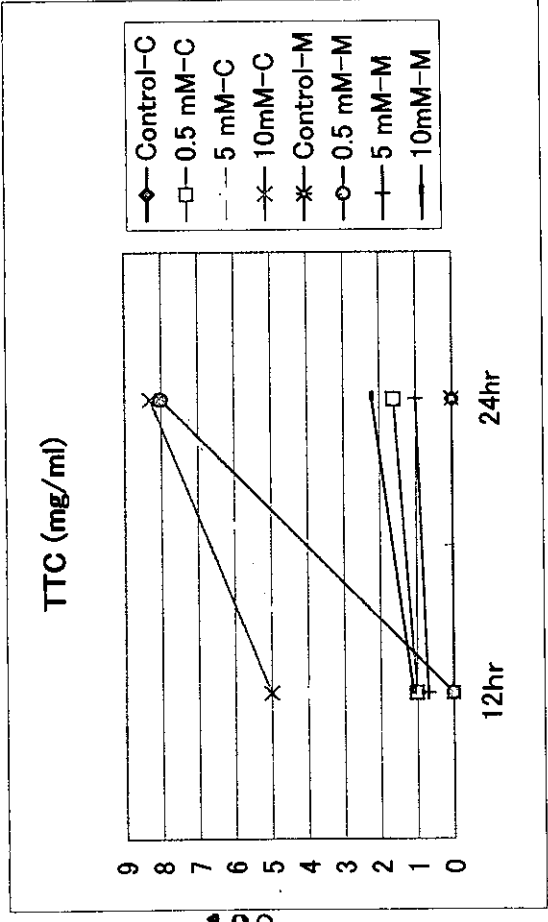


図4A 予備実験4

TTC(mg/ml)	2 hrs	6 hrs	12 hrs	24 hrs
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.5 mM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5 mM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

TCA(mg/ml)	2 hrs	6 hrs	12 hrs	24 hrs
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.5 mM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5 mM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

LDH (IU/l)	2 hrs	6 hrs	12 hrs	24 hrs
Control	108	155	137	176
0.5 mM	109	131	149	135
5 mM	100	151	127	128

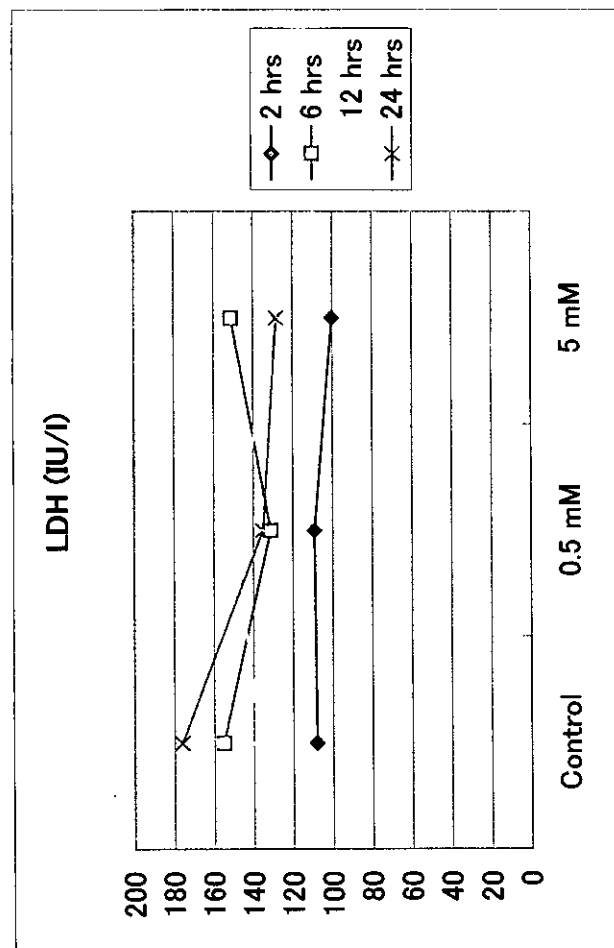


図5A 予備実験5

TTC(mg/ml)

	4 hrs	24 hrs
Control	n.d.	n.d.
0.5 mM	0.6	1.6
5 mM	0.7	2.7
5 mM gel(-)		6.7

TCA(mg/ml)

	4 hrs	24 hrs
Control	n.d.	n.d.
0.5 mM	n.d.	n.d.
5 mM	n.d.	n.d.
5 mM gel(-)		n.d.

LDH (IU/l)

	4 hrs	24 hrs
Control	20	41
0.5 mM	23	45
5 mM	27	37
5 mM gel(-)		19

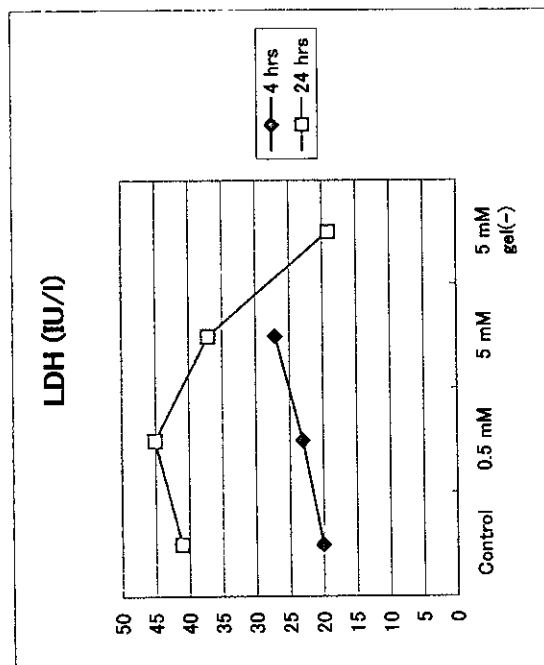
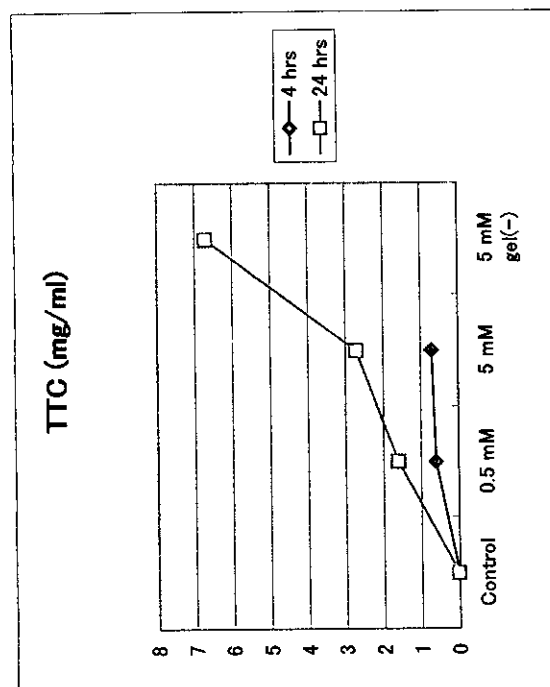


図6A 予備実験6

TTC(mg/ml)
collagen gel

5 × 10 ⁵ cell/ml	4 hrs	24 hrs
DMSO	n.d.	n.d.
0.5mM	n.d.	0.8
5.0mM	n.d.	1.85

LDH (IU/l)
collagen gel

5 × 10 ⁵ cell/ml	4 hrs	24 hrs
DMSO	10	14
0.5mM	17.5	12
5.0mM	9	14

collagen gel

1 × 10 ⁶ cell/ml	4hr	24 hrs
DMSO	n.d.	n.d.
0.5mM	n.d.	2.5
5.0mM	n.d.	3.4

collagen gel

1 × 10 ⁶ cell/ml	4hr	24 hrs
DMSO		19
0.5mM		18
5.0mM		15.5

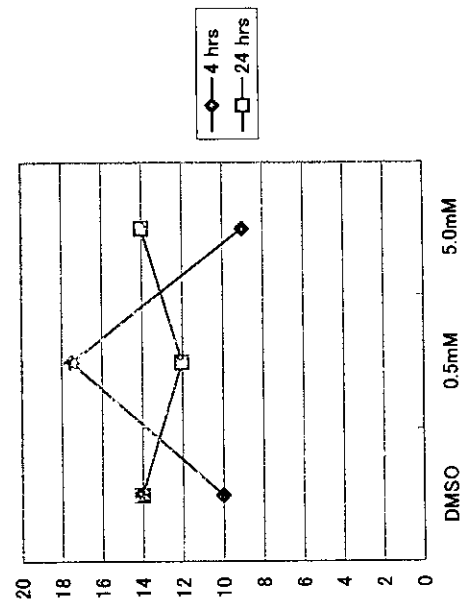
Matrigel

5 × 10 ⁵ cell/ml	4 hrs	24 hrs
DMSO	n.d.	n.d.
0.5mM	n.d.	n.d.
5.0mM	n.d.	1.05

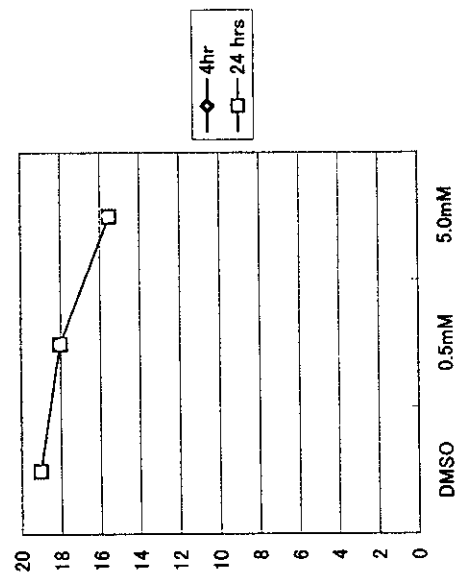
Matrigel

5 × 10 ⁵ cell/ml	4 hrs	24 hrs
DMSO	12	23
0.5mM	17.5	16
5.0mM	13.5	21.5

LDH (IU/l)
collagen gel 5 × 10⁵ cell/m



LDH (IU/l)
collagen gel 1 × 10⁶ cell/ml



LDH (IU/l)
Matrigel 5 × 10⁵ cell/m

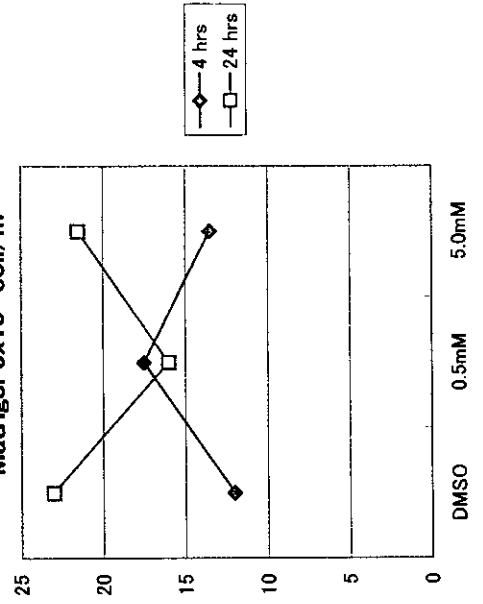


図7A 予備実験7

LDH (IU/l)				
	4 hrs	6 hrs	24 hrs	
Control	12	20	18	
0.5 mM			31	
1 mM	33	21	21	
5mM			51.5	

TCA(mg/ml)				
	4 hrs	6 hrs	24 hrs	
Control	n.d.	n.d.	n.d.	
0.5 mM			n.d.	
1 mM	n.d.	n.d.	n.d.	
5mM			n.d.	

TTC(mg/ml)				
	4 hrs	6 hrs	24 hrs	
Control	n.d.	n.d.	n.d.	
0.5 mM			3	
1 mM	0.6	0.9	4.5	
5mM			5.9	

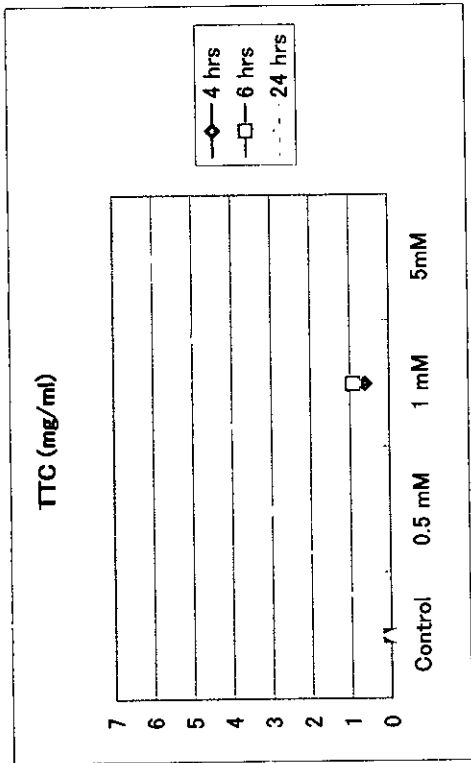
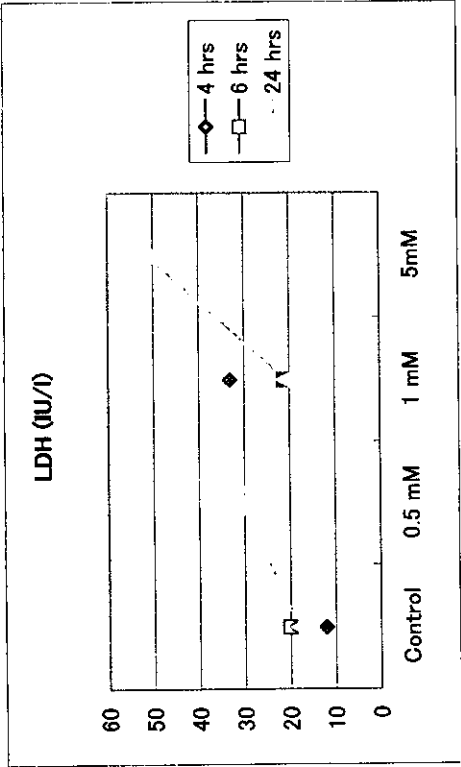


図8A 予備実験8

TTC(mg/ml)

	4 hrs	24 hrs
DMSO	n.d.	n.d.
2.5 mM	1.6	6.7
5 mM		5.6
10 mM		10.7

LDH (IU/l)

	4 hrs	24 hrs
DMSO	330	436
2.5 mM	356	353
5 mM		440
10 mM		271

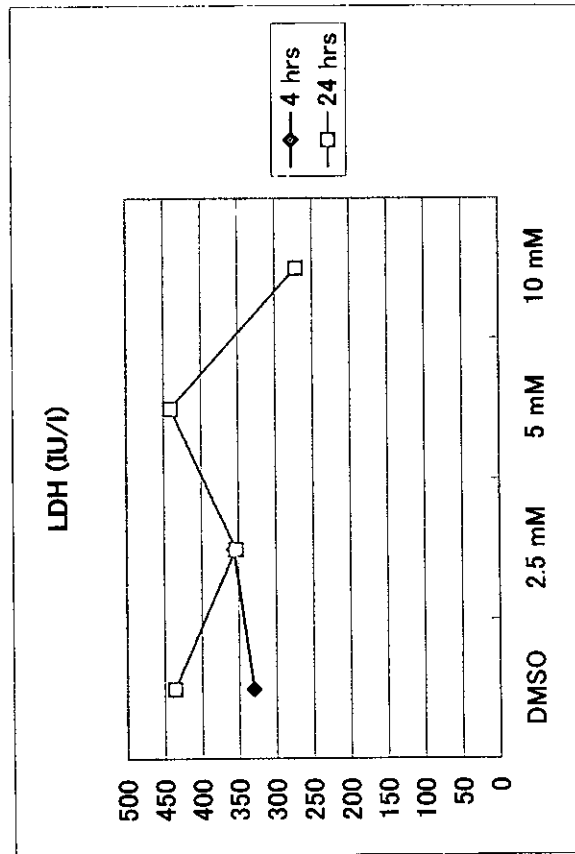
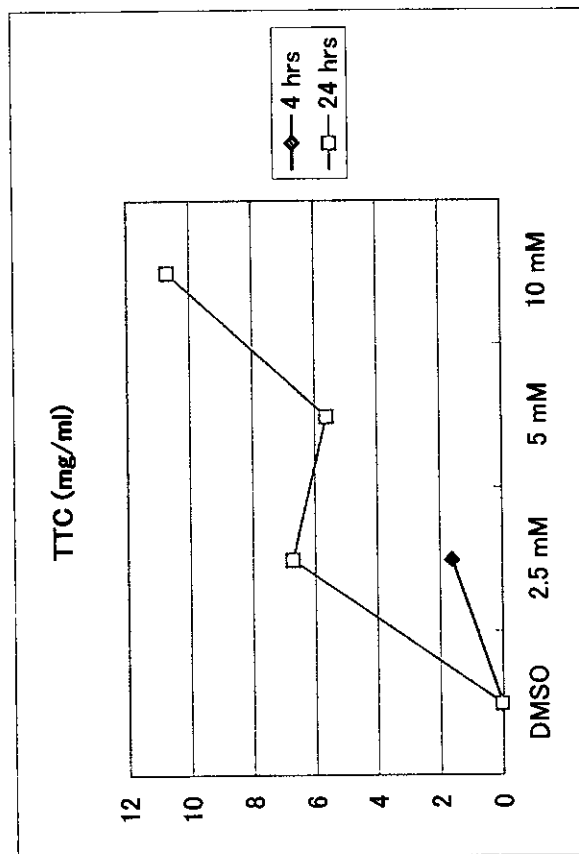


図1B 予備実験1

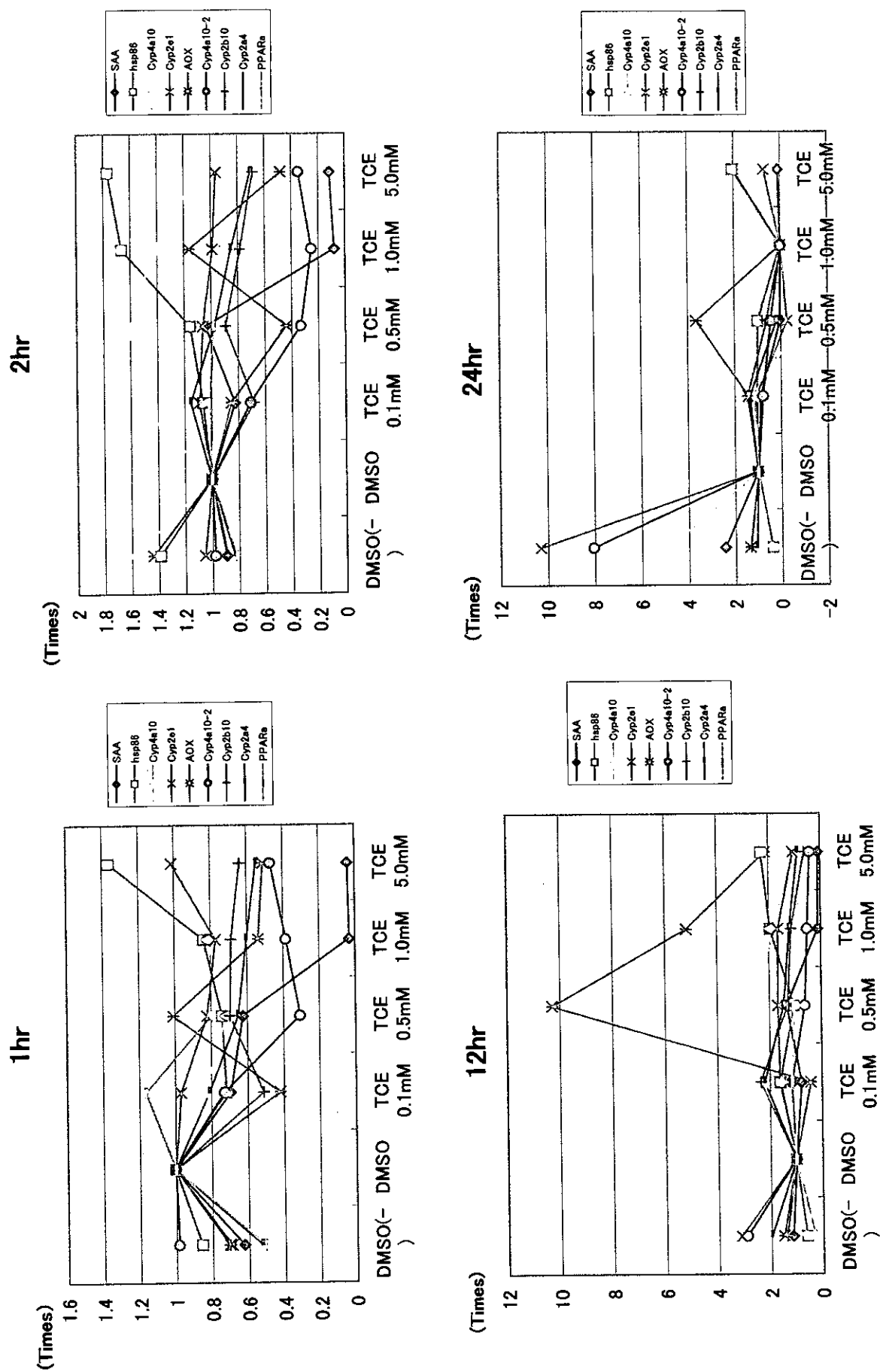
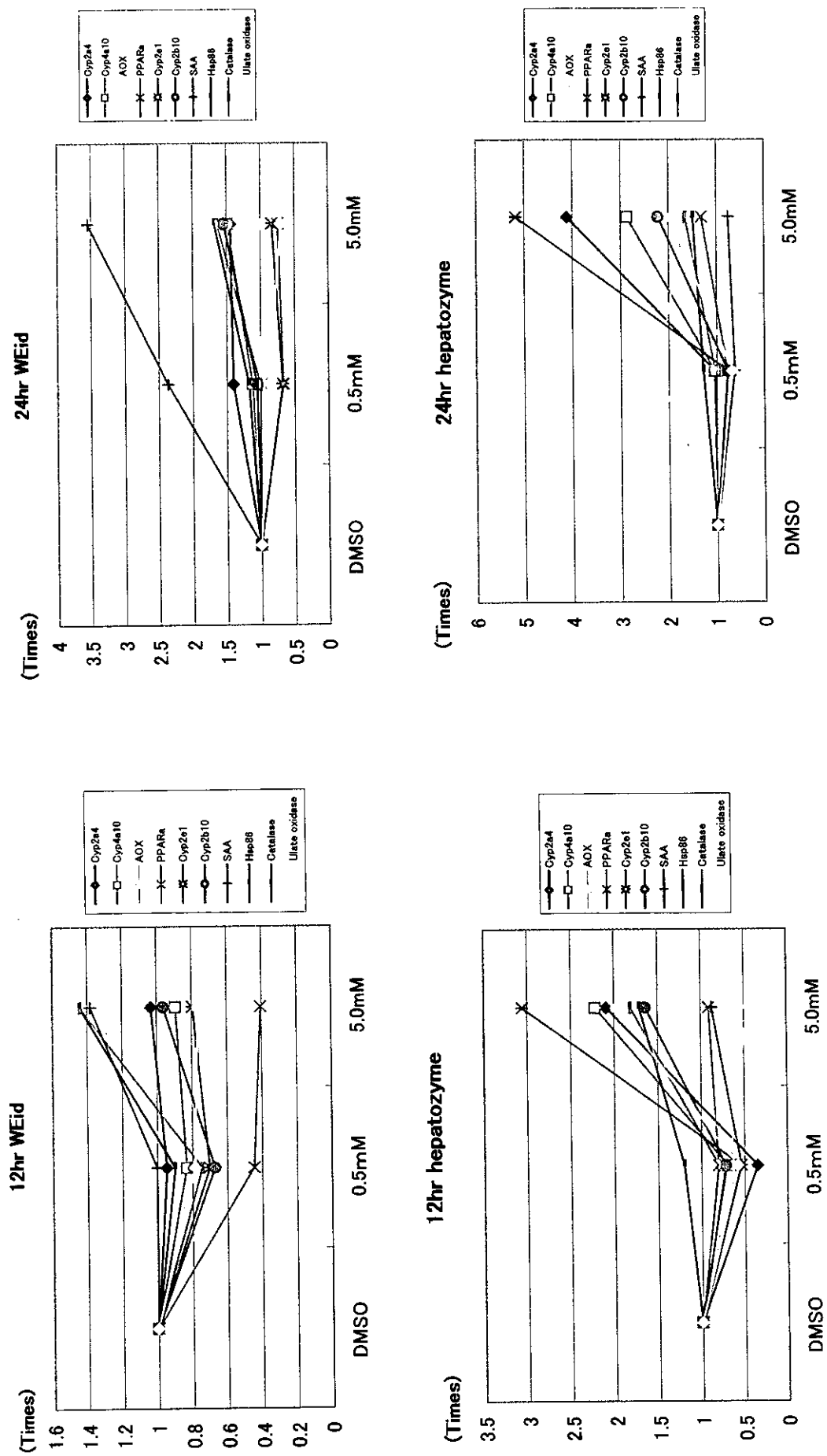


図2B 予備実験2



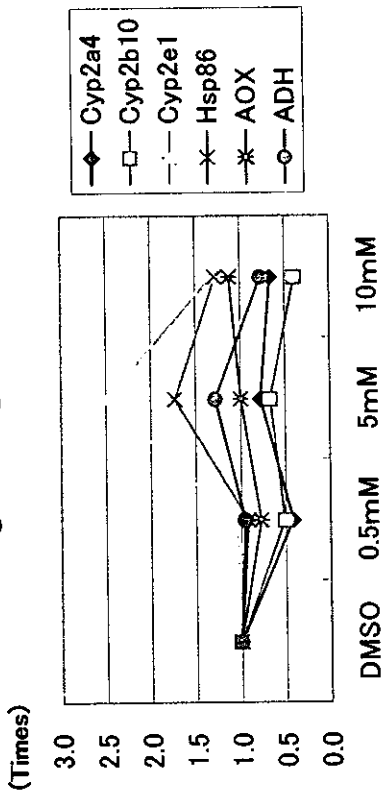
Collagen coat

12hr	Cyp2a4	Cyp2b10	Cyp2e1	Hsp86	AOX	ADH
DMSO	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.5mM	0.41	0.50	1.06	0.91	0.77	0.95
5mM	0.77	0.66	2.50	1.73	0.99	1.28
10mM	0.66	0.39	1.32	1.27	1.11	0.77

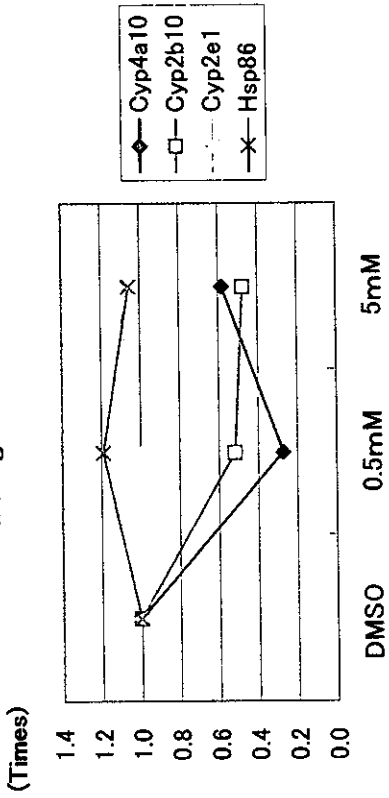
Matrigel

12hr	Cyp4a10	Cyp2b10	Cyp2e1	Hsp86
DMSO	1.00	1.00	1.00	1.00
0.5mM	0.27	0.51	1.00	1.19
5mM	0.58	0.47	1.11	1.06

collagen coat gel 12hr



Matrigel 12hr



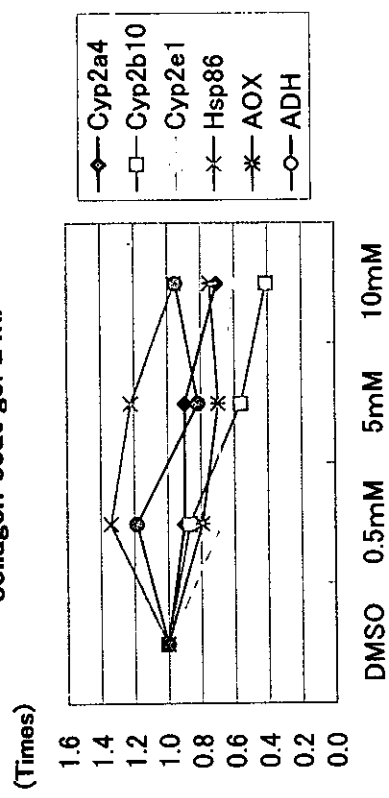
Collagen coat

24hr	Cyp2a4	Cyp2b10	Cyp2e1	Hsp86	AOX	ADH
DMSO	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.5mM	0.90	0.87	0.68	1.34	0.79	1.18
5mM	0.90	0.56	0.68	1.22	0.69	0.82
10mM	0.70	0.41	0.61	0.96	0.74	0.95

Matrigel

24hr	Cyp4a10	Cyp2b10	Cyp2e1	Hsp86
DMSO	1.00	1.00		1.00
0.5mM	0.60	0.82		0.61
5mM	0.55			1.14

collagen coat gel 24hr



Matrigel 24hr

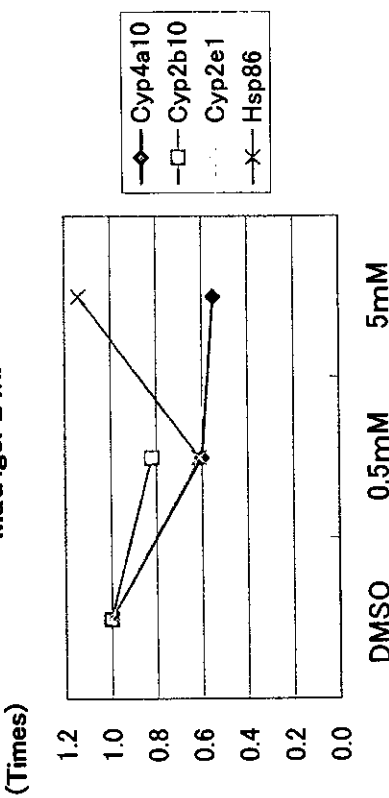
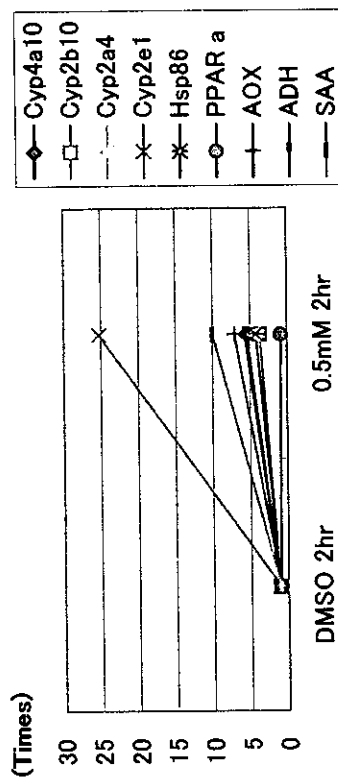


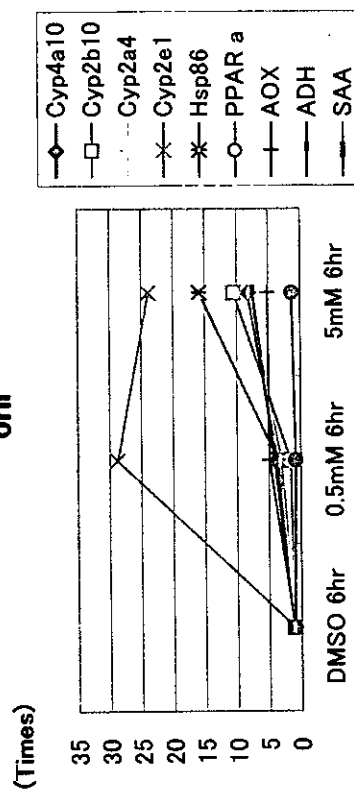
图4B 丁酮美联4

	Cyp4a10	Cyp2b10	Cyp2a4	Cyp2e1	Hsp86	PPAR a	AOX	ADH	SAA
DMSO 2hr	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.5mM 2hr	5.41	3.63	4.26	25.28	4.13	0.83	7.04	5.64	10.02
DMSO 6hr	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.5mM 6hr	3.71	1.49	2.53	28.74	3.53	0.73	4.92	4.07	3.08
5mM 6hr	8.14	10.37	15.73	23.83	15.83	1.31	5.13	7.44	8.08
DMSO 12hr	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
5mM 12hr	2.56		2.40	0.09	1.45	1.29	1.39	0.56	3.34
DMSO 24hr	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.5mM 24hr	0.94	1.62	1.02	0.28	1.10	1.16	3.15	0.32	2.01
5mM 24hr	1.65	3.25	1.19	0.29	1.74	2.09	3.27	1.29	3.19

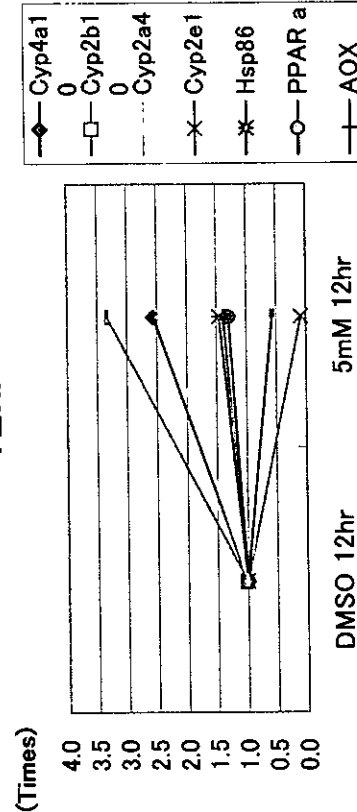
2hr



6hr



12hr



24hr

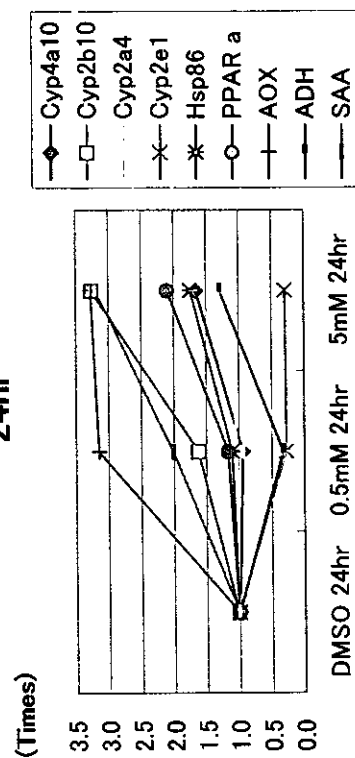


図5B 予備実験5

	Cyp4a10	Cyp2a4	Cyp2b10	Cyp2e1	AOX	ADH	catalase	Urate Oxidase	PPARa	SAA
DMSO 4hr	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.5mM 4hr	1.84	1.63	1.48	1.77	1.07	1.49	1.38	1.46	0.93	1.33
5mM 4hr	0.95	1.01	0.73	0.78	0.73	1.34	1.05	1.36	0.86	0.81
	Cyp4a10	Cyp2a4	Cyp2b10	Cyp2e1	AOX	ADH	catalase	Urate Oxidase	PPARa	SAA
DMSO 24hr	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.5mM 24hr	1.80	1.44	1.64	0.90	1.36	1.84	1.49	0.90	0.64	1.75
5mM 24hr	2.17	0.42	1.64	0.33	1.28	1.77	1.34	0.37	0.75	1.94

